

Common wild-rice near isogenic line resisting bacterial leaf-blight and its breeding process

Patent number: CN1241630
Publication date: 2000-01-19
Inventor: ZHANG QI (CN); ZHAO BINGYU (CN); WANG CHUNLIAN (CN)
Applicant: CROP BREEDING AND CULTIVATION (CN)
Classification:
- international: **A01H1/02; A01H5/00; C12N1/20; C12Q1/04; C12Q1/68; A01H1/02; A01H5/00; C12N1/20; C12Q1/04; C12Q1/68; (IPC1-7): C12N1/20; C12Q1/04; C12Q1/68**
- european:
Application number: CN19990111577 19990818
Priority number(s): CN19990111577 19990818

Report a data error here

Abstract of **CN1241630**

The present invention relates to one rice *Xanthomonas* line PX099. One near isogenic line carrying common wild rice bacterial leaf-blight resisting new gene Xa23 is cultivated and one new technology system is established, which relates to biological technology, plant pathology, genetic breeding technology and molecular labelling and aims at obtaining near isogenic line Xa23 as one rare excellent highly disease resisting gene. The new gene has very wide resistance spectrum and very strong resistance entering effect, and may be used to effectively improve the disease resistance of hybrid rice and long-shaped rice.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl^P

C12N 1/20

C12Q 1/04, C12Q 1/68

//(C12N1/20, C12R

1:64)

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 99111577.5

[43] 公开日 2000 年 1 月 19 日

[11] 公开号 CN 1241630A

[22] 申请日 1999.8.18 [21] 申请号 99111577.5

[71] 申请人 中国农业科学院作物育种栽培研究所

地址 100081 北京市海淀区白石桥路 30 号

[72] 发明人 章 琦 赵炳宇 王春连 杨文才

顾更生 邢全党 周永力 林世成

[74] 专利代理机构 农业部专利事务所

代理人 黄家俊 张 文

权利要求书 1 页 说明书 3 页 附图页数 2 页

[54] 发明名称 普通野生稻抗白叶枯病近等基因系及其培育方法

[57] 摘要

本发明涉及一个能鉴定和检测对水稻白叶枯病具特异性的水稻质单胞菌系 P X099。培育了拥有普通野生稻抗白叶枯病新基因 Xa23 的近等基因系。构建了集生物技术、植物病理、遗传育种及分子标记多学科获得拥有普通野生稻 1 个罕见的优异高度抗病新基因 Xa23 近等基因系的系统技术体系。本发明 在迄今同类近等基因系中,其拥有的新基因是抗病最广、抗性异源效应最强,能有效改良我国杂交稻和籼稻抗病性的特点。

ISSN 1008-4274

专利文献出版社出版

BEST AVAILABLE COPY

权 利 要 求 书

1. 可用以鉴定特异抗白叶枯病基因的 1 个水稻黄单胞致病变种(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) 菌系 PXO99 已于 1999 年 7 月 14 日由中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心保藏, 在该中心登记入册的编号是 CGMCC NO.0406.;

2. 一套来自普通野生稻抗白叶枯病近等基因系的培育方法, 其特征在于有下列步骤组成, 全部程序均必须:

1) 采用包括白叶枯病广致病菌系 PXO99 在内的 9 个国际的、3 个日本的和 7 个中国的共 19 个菌系对普通野生稻抗源接种鉴定, 获得 1 个全生育期抗全部菌系的广谱抗源;

2) 采用花培单倍体育种技术加速纯合该普通野生稻 抗源的抗性, 通过野栽杂交, 将该种质的抗病性导入 1 个株型良好的籼型栽培稻 JC30, 获 F₁ 植株, 选择高抗菌系 PXO99 的单株进行花药培养获得 H₁, 自交 3 次, 逐代用 PXO99 菌系鉴定, 获得全生育期稳定表达高度抗病的抗性纯合系 H₄;

3) 采用 PXO99 揭示 WBB1 的抗性遗传基础及其抗性表达类型

在这今国际正式命名的栽培稻种的所有抗白叶枯病显性基因中都不能抵御 PXO99 的侵袭, 仅有来自野生稻的 Xa-21 和该纯合系 H₄ 对 PXO99 是能抵御的, 遂分析了 H₄ 对 PXO99 的抗性遗传模式, 揭示了 H₄ 携带的抗性基因对 PXO99 的高度抗病性由一对完全显性抗病基因控制, 该基因是自苗期至成株期均表达抗性的全生育期抗性, 而 Xa-21 对 PXO99 的抗性至分蘖盛期才能表达, 两者间等位性测定显示为非等位基因, 表明 WBB1 拥有一对新基因, 暂命名为 Xa23;

4) 构建拥有抗病基因 Xa-23 的近等基因系

以感病籼稻品种 JC30 与花培抗病纯合系 H₄ 杂交, 又以 JC30 为轮回亲本回交, 每代分别用专化抗性菌系 PXO99 接种鉴定, 选留 14 株在苗期具有显性抗性表达, 显示轮回亲本的性状的单株, 继续与轮回亲本回交至 BC₁F₁, 再自交至 BC₁F₂, 获得一对遗传背景与轮回亲本基本一致, 目标抗性清晰而稳定的近等基因系 WBB1;

5) SSR 分子标记选择

用拥有 Xa-23 抗性基因的近等基因系 WBB1 与感病品种 JC30 杂交的 F₁ 和 F₂ 分离群体, 选择与目标抗病基因连锁的 SSR 分子标记, 先用菌系 PXO99 接种 F₁ 和 F₂, 获得抗和感的反应参数资料, 选择 160 株 F₂ 进行叶片基因组总 DNA 提取, 按常规 PCR 反应选了 160 对 SSR 引物, 获得 2 对能在亲本和抗感 DNA 池之间检测到多态性的引物, OSR6 和 RM224, 用其分别对选出的 160 个 F₂ 单株进行共分离分析, 并采用作图软件 Mapmarker3.0 分析遗传图距, 发现 OSR6 与新基因 Xa-23 紧密连锁, 图距为 5.3CM, RM224 与 Xa-21 的遗传图距为 27. CM.

普通野生稻抗白叶枯病近等基因系及其培育方法

本发明涉及基因工程领域,具体涉及一个来自普通野生稻的携有高抗水稻白叶枯病新基因的近等基因系。

水稻白叶枯病是一个全球性的重要细菌性病害。80年代以来我国大面积种植的水稻品种拥有单一的抗病基因 Xa-4,致使对 Xa-4 有毒的 5 型菌上升为优势菌,潜在着品种丧失抗性的风险。国际水稻研究所(IRRI)60 年代投放大量携带基因 Xa-4 的品种,在东南亚国家业已大面积感病化^[1]。迄今,由日本与 IRRI 合作鉴定 21 个抗白叶枯病基因中,多数为抗谱较窄或为隐性基因,不便于育种,只有近年由 Khush 等(1990)从长药野生稻(*O. longistaminata*)中鉴定到的新基因 Xa-21^[2],其广谱抗性本发明相似,即对当时包括对 1 个广致病力的专化菌系 PXO99 在内的 6 个国际白叶枯病生理小种均能抵御。但是 Xa-21 基因存在以下不足:即 (1) 构建携有该基因的近等基因系时,只进行 4 次回交和 1 次自交,世代较;用于育种导入效应较低。(2) 携有 Xa-21 的基因系 IRBB21 在苗期是感病的,至分蘖期以后才抗病。(3) 可能由于当时尚未明确生理小种 6 号的代表菌系 PXO99 为关键鉴别小种菌系,而采用小种 2 的代表菌系 PXO86 揭示 Xa-21 的抗性遗传基础是不够贴切的。

本发明的目的在于提供 1 个能鉴别特异性的白叶枯病广致病菌系 PXO99,并用此菌系构建了一套携有来自普通野生稻特异基因 Xa23 的近等基因系的方法。

本发明的内容为:

1. 用以鉴定特异抗白叶枯病基因的 1 个水稻黄单胞致病变种(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) 菌系 PXO99 已于 1999 年 7 月 14 日由中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心保藏。在该中心登记入册的编号是 CGMCC NO.0406。

2. 培育方法

成功培育携有特异抗性基因 Xa23 近等基因系的全部程序均必须采用能鉴别该基因的特异广致病菌系 PXO99,方能检测该专化抗性基因是否存在:

1) 采用包括白叶枯病广致病菌系 PXO99 在内的 9 个国际的、3 个日本的和 7 个中国的共 19 个菌系对普通野生稻抗源接种鉴定,获得 1 个全生育期抗全部菌系的广谱抗源。

2) 采用花培单倍体育种技术加速纯合该普通野生稻抗源的抗性。通过野栽杂交,将该种质的抗病性导入 1 个株型良好的籼型栽培稻 JC30,获 F₁ 植株,选择高抗菌系 PXO99 的单株进行花药培养获得 H₁,自交 3 次,逐代用 PXO99 菌系鉴定,获得全生育期稳定表达高度抗病的抗性纯合系 H4。

3) 采用 PXO99 揭示 WBB1 的抗性遗传基础及其抗性表达类型

在迄今国际正式命名的栽培稻种的所有抗白叶枯病显性基因中都不能抵御 PXO99 的侵袭, 仅有来自野生稻的 Xa-21 和该纯合系 H4 对 PXO99 是能抵御的, 遂分析了 H4 对 PXO99 的抗性遗传模式, 揭示了 H4 拥有的抗性基因对 PXO99 的高度抗病性由一对完全显性抗病基因控制。该基因是自苗期至成株期均表达抗性的全生育期抗性, 而 Xa-21 对 PXO99 的抗性至分蘖盛期才能表达。两者间等位性测定显示为非等位基因, 表明 WBB1 拥有一对新基因, 暂命名为 Xa23。

4) 构建拥有抗病基因 Xa-23 的近等基因系

以感病籼稻品种 JC30 与花培抗病纯合系 H4 杂交, 又以 JC30 为轮回亲本回交, 每代分别用专化抗性菌系 PXO99 接种鉴定, 选留 14 株在苗期具有显性抗性表达、显示轮回亲本的性状的单株, 继续与轮回亲本回交至 BC₁F₁, 再自交至 BC₁F₂, 获得一对遗传背景与轮回亲本基本一致, 目标抗性清晰而稳定的近等基因系 WBB1。

5) SSR 分子标记选择

用拥有 Xa-23 抗性基因的近等基因系 WBB1 与感病品种 JC30 杂交的 F₁ 和 F₂ 分离群体, 选择与目标抗病基因连锁的 SSR 分子标记。先用菌系 PXO99 接种 F₁ 和 F₂, 获得抗和感的反应参数资料, 选择 160 株 F₂ 进行叶片基因组总 DNA 提取, 按常规 PCR 反应选了 160 对 SSR 引物, 获得 2 对能在亲本和抗感 DNA 池之间检测到多态性的引物, OSR6 和 RM224, 用其分别对选出的 160 个 F₂ 单株进行共分离分析, 并采用作图软件 Mapmarker (3.0) 分析遗传图距。发现 OSR6 与新基因 Xa-23 紧密连锁, 图距为 5.3CM, RM224 与 Xa-23 的遗传图距为 27.7CM。

3、本发明的优点和积极效果

(1) 设计了新基因鉴定和构建近等基因的技术体系

水稻与白叶枯病保存着典型的基因对基因互作关系的原理和普通野生稻抗病性通常处于杂合状态, 本发明采用的核心技术是: ①全程采用广致病菌系 PXO99; ②采用花培单倍体育种技术构建新基因抗病纯合系; ③多代回交逐代同步进行专化菌系检测抗病性和农艺性状选择。构建拥有新基因的 Xa-23 的抗病近等基因系。

(2) 构建拥有 Xa-23 基因的近等基因系中, 充分考虑到将轮回亲本 JC30 的遗传成份恢复到拥有目标抗性基因系中, 因而回交和自交的总代数较多, 从而建成了遗传背景与轮回亲本高度一致而专化抗性清晰、稳定的近等基因系, 为基因克隆提高效率。

(3) 育成的近等基因系 WBB1 拥有的普通野生稻抗白叶枯病新基因 Xa-23, 是迄今国际已命名的抗病基因中抗谱最广、抗性导入效应极强、水稻全生育期都高度抗病的完全显性基因。它将在改变我国抗白叶枯病基因利用单一的严

峻现状、改良我国水稻抗病性上发挥积极作用，并在开展我国水稻分子标记辅助选择育种中起促进作用。

图1 建立普通野生稻抗白叶枯病纯合系及鉴定新基因

图2 培育携带 Xa23 新基因的抗病近等基因系 WBB1 技术程序

图3 新基因 Xa23 在水稻第 11 条染色体上等位置(其它抗白叶枯病基因及其 DNA 标记引自 Causse 等 1994)

材料	抗病基因	对 9 个小种的抗性反应									抗性表达生育期
		P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	
WBB1	Xa-?	R	R	R	R	R	R	R	R	R	全生育期
IRBB21	Xa21	R	R	R	R	R	R	R	R	R	分蘖盛期
IRBB3	Xa3	R	R	R	R	R	S	S	S	R	成株期
IRBB4	Xa4	R	S	S	M	R	S	R	R	S	全生育期
IRBB7	Xa7	MS	R	R	S	R	S	R	R	R(m)	成株期
IRBB10	Xa10	S	R	S	S	R	S	R	S	S	全生育期
IRBB14	Xa14	S	S	S	S	R	S	S	R	S	全生育期
JG30(CK)		S	S	S	S	S	S	S	S	S	全生育期

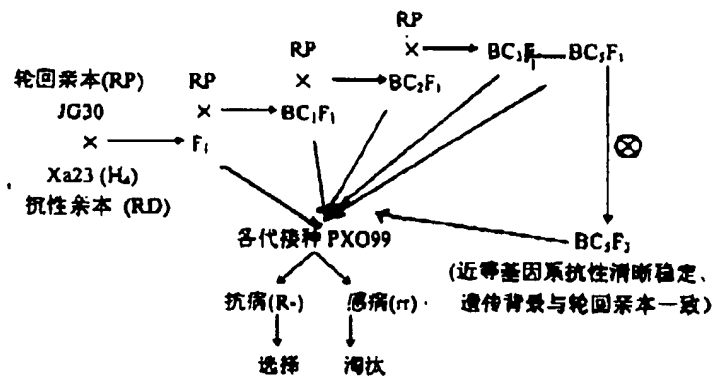
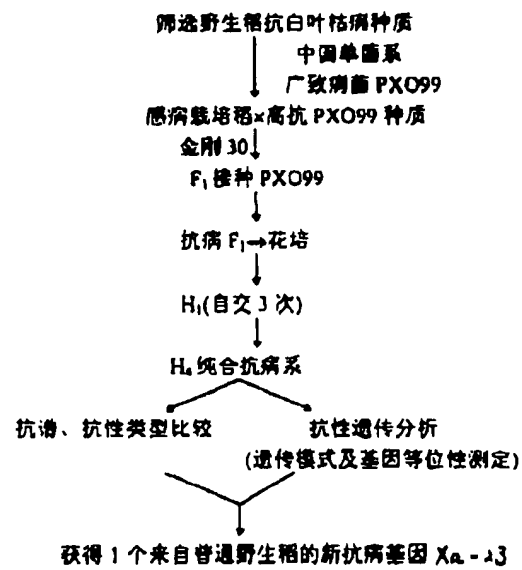
R=抗, M=中抗, S=感

表 1

参考文献

- (1) T. W. Mew 1987, Current status and Future Prospects of research on Bacterial Blight of Rice, Ann. Rev. Phytopathology, 1987, 25: 359~382
- (2) G. S. Khosh et al, A new gene for resistance to bacterial blight from *O. longistaminata*, RCN, 1990, 7: 21~22

说 明 书 附 图



99-08-18

